

低用量維持療法<FSH療法であり、FSH-GnRH律動療法は他の治療法に比較して有意に低率で、FSH療法は高率であった。FSH低用量維持療法はFSH療法よりも低い、完全に抑制できなかった。

2. PCOS患者の治療

PCOS患者におけるFSH単独療法とFSH-GnRH律動療法の治療成績の比較を表2に示した。平均治療日数、排卵率、妊娠率に有意差はなかった。しかし、平均発育卵胞数はFSH療法に比べてFSH-GnRH律動療法は有意に低率であった。視床下部性排卵障害患者での治療成績に比べるとPCOS患者では発育卵胞数が多いため、FSH-GnRH律動療法でも単一卵胞発育率は50%程度であるが、FSH療法では全てが3個以上であり、PCOS患者でもFSH-GnRH律動療法は高率に単一卵胞発育が起こることが認められた。FSH-GnRH律動療法では多胎妊娠はなく、FSH療法に比較して有意に低率であった。また、OHSS発生率もFSH療法に比較してFSH-GnRH律動療法は有意に低率であり、PCOS患者の治療においてもFSH-GnRH律動療法の安全性は高いことが示された。

【考察】

ゴナドトロピンの投与方法を工夫して副作用を軽減する試みとしては、Low-dose法、Step-down法、hMG律動投与方法などが報告されているが、未だ満足できるものはない。

比較的副作用の少ない投与方法と報告されているFSH低用量維持療法について、視床下部性排卵障害患者を対象に検討したところ、排卵率、妊娠率はFSH療法と同等であった。平均発育卵胞数、OHSSの発生率はFSH療法より低率であるものの、FSH-GnRH療法に比較すると高率であった。今回の検討範囲では多胎妊娠は認められなかったが、対象が視床下部性排卵障害であるためと考えられる。平均治療日数は他の2法よりも長く、患者のコンプライアンスは若干低下すると考えられる。今後、PCOS患者でのFSH低用量療法を検討し、本治療法の評価を行う必要があると考えられる。

他方、FSH-GnRH律動療法は、視床下部性排卵障害およびPCOSともに、FSH療法と同等の排卵率、妊娠率を保ったまま、発育卵胞数を減少させ、OHSSの発生を軽減し、多胎妊娠を予防できることが示された。また治療日数も単独療法と変わらず、患者のコンプライアンスも低下することはないと考えられる。さらに、OHSSや多胎妊娠を起こしやすいPCOSにおいて視床下部性無排卵症に対する成績に近い副作用軽減効果が認められたことは、従来ゴナドトロピン療法による治療を逡巡されるようなPCOS群患者にもFSH-GnRH療法を用いることで安全かつ有効な治療が可能になると考えられる。

以上、FSH低用量維持療法の副作用予防効果はFSH-GnRH律動療法にやや劣るが、FSH療法に比較すると副作用予防効果認められるので、PCOS患者や過去にOHSS、多胎妊娠の既往のあるハイリスク症例を除けば有用である可能性があり、今後積極的に使用する価値があるものと思われる。一方、FSH-GnRH律動療法は患者のコンプライアンス、有効性を保ったまま、OHSSや多胎妊娠の副作用を大幅に予防することが可能なゴナドトロピン

投与方法であり、PCOS等の低用量維持療法でも副作用が高率に発生するハイリスク症例に対しても有用であると思われる。ただし、GnRH製剤の使用は現在のところ保険適応されていないので、保険収載に向けて努力する必要がある。

【まとめ】

1. ゴナドトロピン療法の工夫として、現在のところFSH低用量持続療法とFSH-GnRH律動療法が考えられる。
2. FSH低用量持続療法はFSH療法に比べ、多胎妊娠やOHSSの発症を減少できる一方、治療日数が長くコンプライアンスが低く、ハイリスク例では副作用予防効果は十分でない。
3. FSH-GnRH律動療法は副作用の頻度が最も低率であり、PCOSなどのOHSSのハイリスク患者や長期間・連日の通院が困難な症例に対して有用である。しかし、残念ながら現在のところ保険適応がない。

表1 視床下部性排卵障害患者におけるFSH療法、FSH低用量維持療法およびFSH-GnRH療法の臨床成績の比較

治療法	FSH療法	FSH低用量維持療法	FSH-GnRH律動療法
症例数 (周期数)	24 (44)	31 (38)	20 (43)
平均治療日数 (日)	7.3	10.6*	7.4
平均発育卵胞数 (個)	3.9±1.5	3.0±1.0*	1.3±0.6* #
周期別排卵率 (%)	88.6	92.1	88.3
周期別妊娠率 (%)	18.2	18.4	11.6
多胎率 (%)	12.5	0*	0*
OHSS発生率 (%)	38.6	7.7*	0* #

* p<0.01 vs FSH療法

p<0.01 vs FSH低用量維持療法

表2 PCOS患者におけるFSH療法とFSH-GnRH療法と臨床成績の比較

治療法	FSH療法	FSH-GnRH律動療法
症例数 (周期数)	20 (44)	23(67)
治療日数 (日)	7.5	7.6
平均発育卵胞数 (個)	6.3±3.8	2.4±1.5*
周期別排卵率 (%)	88.6	91.0
周期別妊娠率 (%)	29.5	20.9
多胎率 (%)	30.3	0*
OHSS発生率 (%)	43.2	13.4*

* p<0.01 vs FSH療法

【3】プロラクチン分泌異常症

「プロラクチン分泌異常症」座長のまとめ

寺本 明（日本医科大学脳神経外科）

本年度の「プロラクチン分泌異常症」に関する研究報告は3件であり、それぞれ平成11年度の研究を発展させたものであった。

まず宮崎（島根医科大学産婦人科）らは、ラット下垂体腫瘍由来のGH3細胞をモデル細胞として用い、TRHによるMAP (mitogen activated protein) キナーゼ活性化反応と、そのGH3細胞における生理的役割について更なる検討を行った。

TRH刺激でPRL及びGHの両ホルモンの分泌反応は促進したが、両ホルモンの遺伝子発現の変化を特異的プライマーを用いた定量的PCR法を用いて検討したところ、PRLmRNAは有意に増加、GHmRNAは有意に減少した。MAPキナーゼ阻害剤PD098059を用いるとTRH刺激によるPRLmRNAの増加及びGHmRNAの減少はそれぞれ抑制された。

一方、MAPキナーゼシグナル伝達系の上流に位置するMAPキナーゼキナーゼ (MEKK) の恒常活性化型を強制発現するpFC-MEKKベクターをGH3細胞にトランスフェクトするとTRH刺激と同様にPRLmRNAの増加及びGHmRNAの減少がみられた。またTRH刺激でPRLプロモーター (-609~+12) 活性は著明に亢進したが、この変化はPD098059で抑制され、一方GHプロモーター (-563~+30) 活性はTRH刺激により変化を認めなかった。

以上より、TRHがMAPキナーゼ活性化を介してPRL遺伝子発現を促進していること、またTRH刺激によるGHmRNAの減少はMAPキナーゼのGHプロモーターへの直接的な作用ではないことが示唆された。

次に、千原（神戸大学第3内科）らは、彼等が酵母を用いたone hybrid systemによりヒト下垂体ライブラリーからクローニングしたPOU蛋白の一員であるmPOUに関する研究を更に展開した。PRL遺伝子は下垂体特異的転写因子であるPit-1によりその発現が促進されるが、mPOUはPRL遺伝子のPit-1結合DNAエレメントに結合して、特にPit-1及びcAMP存在下にPRL遺伝子発現を増強させることを明らかにしてきた。

mPOUのアミノ酸構造から70~84番目のそれに対応するペプチドを合成し、抗血清を作成した。この抗血清を用いて、ヒトPRL産生腺腫の免疫染色を行ったが、mPOUは細胞質にその局在がみられ、核には明確な局在は得られなかった。GH産生腺腫や非機能性腺腫でもmPOUの局在は同様であった。

以上の結果は、mPOUが核に局在するという予想とは異なったものであった。そこでmPOUの発現ベクターにflag抗体が認識するペプチドに対応するoligo DNAを挿入し、N末端にflag蛋白をつけたmPOUを種々の細胞に発現させた。その結果mPOUの細胞内局在は細胞質に認められる場合と、核にみられる場合があり、前者が70%、後者が30%であった。

以上、mPOUは下垂体腫瘍において特異的分布を示さず、その意義は目下明らかではない。また細胞質に豊富にみられる意義も不明である。

そこでmPOUの生理的意義を明らかにする目的で、Emb (mPOUのマウスホモログ) ノックアウトマウスの作製を試みているとの報告があった。

第3に、加藤 (島根医科大学第1内科) らは、やはり前年度の下垂体腺腫細胞における一酸化窒素 (NO) 合成に関する研究を展開させた。

ラット下垂体前葉には脳型一酸化窒素合成酵素 (bNOS) が存在するが、ヒト下垂体腺腫に関してNOSの酵素及び免疫活性を検討した。免疫染色の結果は、GH産生腺腫ではbNOS及びiNOSのいずれも陰性の場合とbNOSのみ陽性の場合があった。PRL産生腺腫では、bNOSは陰性、iNOS陽性であった。また腺腫細胞を単層培養し、培養液中NO₂-濃度を測定した。非機能性腺腫においては、LHRHと脱分極刺激は培養液中NO₂-量を増加させL-NAMEは低下させた。GH産生腺腫の一部では脱分極刺激後に培養液中NO₂-量が増加傾向を示したが、PRL産生腺腫では影響を与えなかった。

以上より、ヒト下垂体腺腫細胞の多くはNOを遊離すること、GH産生並びに非機能性腺腫の一部はbNOSを発現し、脱分極刺激やLHRHがbNOS活性を刺激すること、PRL産生腺腫では主にiNOSの発現がみられることを明らかにした。

PRL遺伝子発現増幅因子 mPOU の生理的病理的意義

分担研究者	千原和夫（神戸大学医学部第3内科）
研究協力者	置村康彦（神戸大学医学部保健学科医療基礎学） 黒木香恵（神戸大学医学部保健学科医療基礎学） 麓万里子（神戸大学医学部第3内科） 岸本正彦（神戸大学医学部第3内科） 井口元三（神戸大学医学部第3内科）

【背景】

下垂体ホルモンの転写調節機構を理解することは、下垂体ホルモン産生異常症の病態理解のために欠くことのできないものである。これらの機構は、時間的空間的に巧妙に制御された転写因子の発現によることがあきらかとなってきた。GHおよびPRL遺伝子の発現においては、下垂体特異的転写因子であるPit-1が、GH、PRL遺伝子の組織特異的発現を規定するばかりか、種々のホルモンによるGH、PRL発現量の調節にも関与することが報告されている1、2）。

一方、私どもは、PRL遺伝子において最も転写開始点に近いPit-1結合DNA配列である1PにPit-1以外の蛋白が結合し、PRL遺伝子発現を促進する可能性を提唱していたが3）、実際にそのような蛋白があるのか、酵母のone-hybrid systemでクローニングを試み、Pit-1、Oct-1にホモロジーを有するPOU蛋白（mPOU）をクローニングし、mPOUは、Pit-1およびcAMPの存在下にPRL遺伝子発現を著しく活性化することをすでに報告した4）。今年度は、mPOUのGH遺伝子発現に及ぼす効果、ヒト下垂体腫瘍におけるmPOU蛋白の存在、外因性に発現させたmPOUの細胞内局在について検討したので報告する。

【方法および結果】

mPOUのGH遺伝子発現におよぼす効果

ラットGH遺伝子の転写開始点から上流0.5 Kのプロモーター、エンハンサーを含むDNA配列をルシフェーゼの構造遺伝子と結合させたレポーター遺伝子を作製した。このレポーター遺伝子をmPOUの発現ベクター(pcDNA3.1-mPOU)とともにCos7細胞にトランスフェクトしたとき、レポーター遺伝子の発現はmPOU発現ベクターの用量依存性に増加した。しかし、mPOUのGH遺伝子発現効果はPit-1のそれに比べ小さいものであった（Pit-10.25mgとmPOU 1 mgの効果がほぼ同等）。

また、Pit-1発現ベクターとmPOU発現ベクターを同時にトランスフェクトしたとき、PRLレポーター遺伝子発現では、相乗的な活性化がみられたが、GHレポーター遺伝子発現では相加効果しか認められなかった。

ヒト下垂体腫瘍におけるmPOUの存在

一過性発現実験では、PRLおよびGH遺伝子発現をmPOUは促進するという成績が得られたが、はたして、実際にlactotroph, somatotroph に存在し、生理的病理的な役割を果たしているのか明らかではない。

そこで、今回ヒト下垂体腫瘍において、mPOU蛋白が存在するか否か免疫組織化学法を用いて検討した。mPOUのアミノ酸構造から表面に露出していることが推測される70～84番目のペプチドを合成し、これをヘモシアニンとコンジュゲートし家兔に免疫し抗血清を得た。96穴プレートにこのmPOU ペプチドを固相化し、段階的に希釈した抗血清、免疫前血清を加えた後、horse raddish peroxidase 結合抗ウサギIgG抗体を加え、結合したperoxidase 活性を測定することにより抗血清の特異性を検討したところ、抗血清はあきらかにmPOUペプチドを認識することがわかった。

この抗血清を使用して、ヒト下垂体腫瘍（PRL産生腫瘍1例、GH産生腫瘍2例、FSH産生腫瘍1例、非機能性3例）におけるmPOUの存在を検討した。染色性の強弱はあるものの、いずれの腫瘍においてもmPOU様免疫活性は存在した。しかし、その免疫活性は核ではなく細胞質に認められた。

外因性mPOUの細胞内局在

転写因子としての作用を有しているためmPOUは核に存在すると想像していたが、上記成績はその予想に反するものであった。この抗血清はmPOUの70～84番目のペプチドを抗原として作製したものがあるが、この領域はちょうど、protein kinase Aによりリン酸化されるアミノ酸配列を有している。この抗血清はこの部位がリン酸化されたmPOUは認識しないと考えられるが、転写因子のなかにはリン酸化によって細胞内局在が変化するものがあり、mPOUの場合もリン酸化によって細胞内局在が変化し、みかけ上細胞質に局在しているようにとらえられた可能性も否定できないため、別の方法でmPOUの細胞内局在を検討した。

mPOUの機能解析実験に使用したpcDNA3.1-mPOUにflag抗体5)が認識するペプチドに対応するoligoDNAを挿入し、N末端にflagペプチドがついたmPOUを発現するベクター(pcDNA3.1mPOU-flag)を構築した。このベクターをCos 7細胞にトランスフェクトした後、flag抗体を用いてmPOU-flagの細胞内局在を検討した。

pcDNA3.1mPOU-flagをトランスフェクトしないときは、flag様免疫活性は全く検出されなかった。pcDNA3.1mPOU-flagをトランスフェクトしたとき、flag様免疫活性は検出されたが、細胞質にmPOU-flagが認められるもの(約70%)と、核に認められるもの(約30%)と2とおりの存在様式を示した。

【考察】

mPOUは、PRL遺伝子の転写開始点から最も近位のPit-1結合エレメントへの結合活性に基づきクローニングされたものであるが、Pit-1結合エレメントを持つほかの遺伝子発現を

活性化するか否かこれまで不明であった。今回初めて、一過性発現系においてmPOUはGHレポーター遺伝子を用量依存性に活性化することが明らかになった。また、PRL遺伝子発現とは異なり、GH遺伝子発現はmPOU単独である程度活性化されたが、mPOUとPit-1による相乗効果は認められなかった。これらの成績は、GH遺伝子発現におけるmPOUとPit-1の作用機構、およびmPOUのPRL、GH遺伝子発現に果たす役割に違いがある可能性を示唆している。

GH遺伝子におけるmPOU結合エレメントについて、現時点では不明である。しかし、mPOUとPit-1をコトランスフェクションしたとき、GHレポーター遺伝子発現に相加効果が認められたことは、この点を考察する上で興味深い。mPOUとPit-1が同一エレメントを認識するなら、通常、相加効果が認められないと考えられるので、この成績はGH遺伝子において、それぞれの結合エレメントが異なる可能性を示唆する。この点に関しては、今後、GH遺伝子を順次切断したレポーター遺伝子、あるいは変異GHレポーター遺伝子を作製し発現実験をおこない、mPOUの作用点を特定する必要がある。

mPOUはヒト下垂体ライブラリーからクローニングされたものである。下垂体にそのmRNAが存在すると考えられる。また、ラット下垂体由来の細胞株で、GH、PRLを産生するGH 3細胞にも、そのmRNAが存在するので、実際にGH、PRL産生細胞においてmPOUが機能していると想定される。しかし、下垂体におけるmPOU蛋白の存在についての報告はまったくなく、mPOUの生理的作用を検討する上で、この点について明らかにする必要があった。免疫組織化学による検討では、検索し得た種々のヒト下垂体腫瘍において、核ではなく細胞質にmPOU様免疫活性を検出した。外因性にflagエピトープをつけたmPOUを発現させたところ、細胞質にmPOUが検出される細胞と、核にmPOUが検出される細胞の両者が存在したが、両者が存在する理由については不明である。これは、外因性に発現させたmPOUについての検討であり、内因性mPOUの存在様式と同一であるかどうか不明であるが、核に局在することが知られているPit-1とは、その存在様式において異なっている可能性が示唆された。

mPOUはPRL、GH遺伝子発現を活性化するものの、下垂体において、特定の細胞に特異的な存在様式を示さず、また、核に比べ細胞質に豊富にみられることなど、その生理的意義について不明確なところがある。そこで、mPOUの生理的意義を明確にするため、現在GFPノックインターゲットベクター作製した。これを用いて、ノックアウトされたEmb (mPOUのマウスホモログ) に代わり、Emb遺伝子の制御下にGFPが発現されるマウスの作製を予定している。これにより、mPOUの時間的空間的発現様式、および生理的意義をより明らかにしたい。

【文献】

1. Ingraham HJ, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn AE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain

- specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55: 519, 1988.
2. Day RN, Koike S, Sakai M, Muramatsu M, Maurer RA. Both Pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene. *Mol. Endocrinol.* 4: 1964, 1990.
 3. Okimura Y, Howard PW, Maurer RA. Pit-1 binding sites mediate transcriptional responses to cyclic adenosine 3',5'-monophosphate through a mechanism that does not require inducible phosphorylation of Pit-1. *Mol. Endocrinol.* 8: 1559, 1994.
 4. Fumoto M, Okimura Y, Iguchi G, Kishimoto M, Mizuno I, Takahash Y, Kaji K, Abe H, Chihara K. Cloning of a POU protein binding to Pit-1 binding element of prolactin gene from human pituitary cDNA library using one hybrid system 81st Annual meeting of The Endocrine Society, 199, 1999.
 5. Hopp TP, Prickett KS, Price V, Libby RT, March CJ, Cerretti P, Urdal DL, Conlon PJ. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein. *Biotechnology* 6: 1205, 1988.

TRH刺激によるMAPキナーゼ活性化とプロラクチン、成長ホルモンの遺伝子発現の変化について

分担研究者 宮崎康二（島根医科大学産科婦人科）
研究協力者 金崎春彦（同）
山本秀幸（熊本大学第一薬理学）
福永浩司（同）
宮本英七（同）

【背景】

下垂体ホルモン産生腫瘍に代表されるホルモン分泌異常症の病態を解明する為には、下垂体ホルモンの合成メカニズム、分泌メカニズムの詳細を明らかにする基礎的研究が重要である。これまでに我々は細胞内の情報伝達をつかさどる多くの情報伝達物質の中で、特に細胞の増殖や分化を中心に主要な役割を果たすセリン・スレオニンキナーゼである mitogen-activated protein kinase (MAPキナーゼ) に注目し、代表的なプロラクチン分泌刺激である thyrotropin-releasing hormone (TRH) によるMAPキナーゼ活性化反応とその生理的役割について検討を行ってきた。その中でMAPキナーゼ活性化はプロラクチンの合成、細胞増殖能の抑制、細胞形態の変化に関わることを明らかにしてきた。プロラクチン産生細胞は成長ホルモン産生細胞と共に下垂体前葉好酸性細胞に属し、共にTRHによるコントロールを受けて細胞動態を変化させている可能性が示唆されており、このことはプロラクチン産生腫瘍、成長ホルモン産生腫瘍の性質を知る一つの手がかりを得るものと考えられる。今回我々は成長ホルモン、プロラクチン両産生能を持つラット下垂体GH3細胞を用い、TRH刺激による両ホルモン分泌反応の変化、遺伝子発現の変化、また各々に対するMAPキナーゼの役割について検討を進めた。

【方法】

GH3細胞は25%ウマ血清、2.5%ウシ胎児血清を含むF-10メディウムを用いて培養した。プロラクチン、成長ホルモン分泌量は特異的RIAにて測定した。ホルモンmRNA量は特異的プライマーを用いた定量的PCR法にて解析した。恒常活性化型MEKKベクターはリポフェクタミンを用いてGH3細胞に強制発現させ、MAPキナーゼはMAPキナーゼアッセイキット（アマシャム）を用いて測定した。成長ホルモン、プロラクチンプロモーター領域はGH3細胞のゲノムDNAよりクローニングし、pGL3ルシフェラーゼベクターに挿入してルシフェラーゼアッセイを行い、転写活性を測定した。

【結果】

GH3細胞をTRHで刺激し、分泌されたホルモン量をRIAにて測定した。TRHはプロラクチン、成長ホルモンの両ホルモンの分泌を促進し、この分泌促進はMAPキナーゼ阻害剤PD098059で阻害されなかった。しかし両ホルモンともTRH刺激による分泌促進反応はカルシウム依存性キナーゼII阻害剤、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤で完全に阻害された。された。(図1)。ホルモン遺伝子発現の変化を検討すると、TRH投与によりプロラクチンmRNA量は増加し、反対に成長ホルモンmRNA量は減少した。TRHによるプロラクチンmRNAの増加はPD098059で完全に阻害され、成長ホルモンmRNAの減少もTRHで阻害された。PD098059は単独でプロラクチンmRNAの減少、成長ホルモンmRNAの増加を細胞にもたらし(図2)。MAPキナーゼのホルモン遺伝子発現への役割を更に検討するため、恒常活性化型MEKキナーゼベクターをGH3細胞に強制発現させ、細胞内ホルモン遺伝子を検討した。恒常活性化型MEKキナーゼベクターを細胞にトランスフェクトすると、細胞内のプロラクチンmRNA量は増加し、逆に成長ホルモンmRNA量は減少し、TRH刺激と同様の変化が生じた(図3)。MAPキナーゼの両ホルモンのプロモーター領域に対する影響をルシフェラーゼアッセイを用いて測定した。プロラクチンプロモーター(-609~+12)活性はTRHで著明に増加しこの活性化はPD098059で著明に抑制された。一方成長ホルモンプロモーター活性(-563~+30)はTRH刺激による変化はなかった(図4)。

【考察】

これまでに我々はTRH刺激によるプロラクチンの分泌、合成がどのような細胞内情報伝達系によって制御されているのか検討を行い、プロラクチンの分泌が主としてカルシウムに依存するカルシウム依存性キナーゼII、ミオシン軽鎖キナーゼにより制御されていることを報告し、プロラクチンの合成はMAPキナーゼに依存することを蛋白レベルで明らかにしてきた(文献1)。GH3細胞はラット下垂体腫瘍由来のcell lineでありプロラクチンと共に成長ホルモンを分泌し、ホルモン研究のモデル細胞として広く用いられている。正常の下垂体前葉細胞には成長ホルモンのみを分泌するsomatotrophとプロラクチンのみを分泌するlactotroph、及びプロラクチン・成長ホルモンの両ホルモンを分泌するsomatotrophが存在することが分かっており、これらの細胞の割合は妊娠や生理的活性物質の影響により変化するとされている(文献2)。そのうちTRHはsomatotrophの数を減少させ、somatolactotroph及びlactotrophの数を増加させることからプロラクチンは成長ホルモン産生細胞を発生由来とする事が示唆されている(文献3)。実際、somatolactotrophであるGH3を用いた我々の実験においてもTRHはプロラクチンmRNAを増加させ、成長ホルモンmRNAを減少させた。このことはTRHが成長ホルモン減少能を持つことを示している。またこの減少にはMAPキナーゼの活性化が重要であることが阻害剤、及び恒常活性化型MEKキナーゼを用いた実験で明らかとなった。プロラクチン遺伝子の転写活性はTRH刺激で著明に増加し、MAPキナーゼがプロラクチンプロモーター領域に作用してmRNAを増加させていると推測されたが、成長ホルモンプロモーターTRH刺激で変化無く、TRH投

与による成長ホルモンmRNAの減少は転写活性を介さない何らかの機序で生じていると考えられる。TRH刺激でプロラクチン、成長ホルモンの合成がMAPキナーゼにより相反する制御を受ける一方で、TRHはGH3細胞より両ホルモンの分泌を共にカルシウム依存性キナーゼの関与で引き起こすことが示唆された。これらの結果は分泌刺激によるホルモンの分泌と合成の2つの現象はそれぞれ異なる細胞内の情報伝達系によって調節されていることを示している。GH3細胞は下垂体腺腫由来の腫瘍細胞であり、あくまでも実験モデルであるが、正常の下垂体前葉細胞でも同様の結果を得ることが出来るのか今後の検討課題である。

プロラクチン分泌異常症の病態を考える上で、プロラクチンの合成異常であるのか、分泌反応そのものの異常であるのか、その中で細胞内情報伝達物質はどう関与するのか各病態における個別の解明が治療を可能法を確立する上で重要であろう。またTRHはGH3細胞において成長ホルモンの合成を著明に減少させた。正常のヒト下垂体成長ホルモン産生細胞はTRHに反応を示さず、末端肥大症患者においてはTRHで分泌反応が生じることが報告されている（文献4）。末端肥大症患者における成長ホルモン産生に対するTRHの効果及び作用機序解明も今後明らかにすべき重要な課題と考えている。

【文献】

1. Kanasaki H, Fukunaga K, Takahashi K, Miyazaki K, Miyamoto E: Mitogen-activated protein kinase activation by stimulation with thyrotropin-releasing hormone in rat pituitary GH3 cells. *Biol Reprod* 61: 319-325, 1999.
2. Goluboff LH, Ezrin C: Effect of pregnancy on the somatotroph and the prolactin cell of human adenohypophysis. *J Clin Endocrinol Metab* 29: 1533-1541, 1969.
3. Boockfor FR, Hoeffler JP, Frawley LS: Cultures of GH3 cells are functionally heterogeneous: Thyrotropin-releasing hormone, estradiol cause reciprocal shifts in the proportion of growth hormone and prolactin secretors. *Endocrinology* 117: 418-420, 1985.
4. Giustina A, Doga M, Bresciani E, Bussi AR, Chiesa L, Misitano V, Giustina G: Effect of glucocorticoids on the paradoxical growth hormone response to thyrotropin-releasing hormone in patients with acromegaly. *Metabolism* 44: 379-383, 1995.

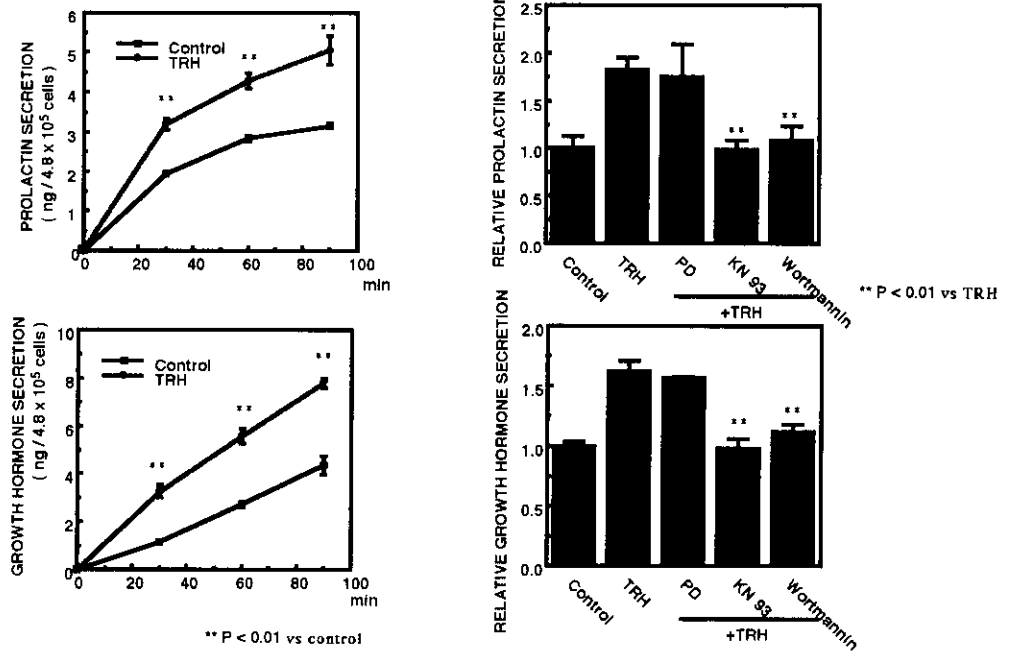


Figure 1

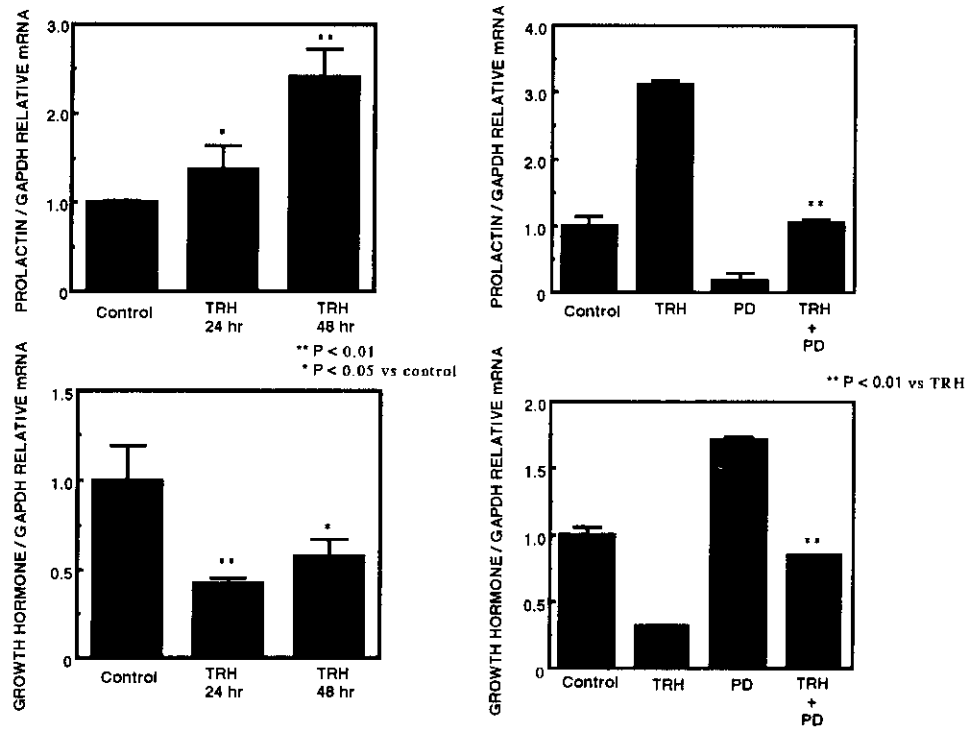
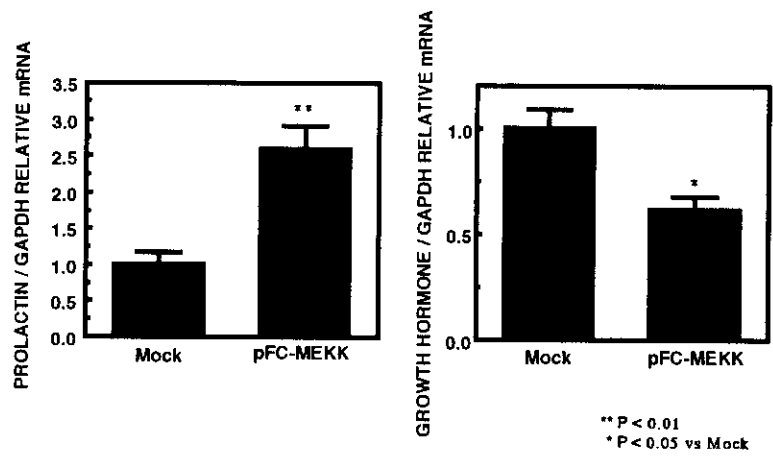
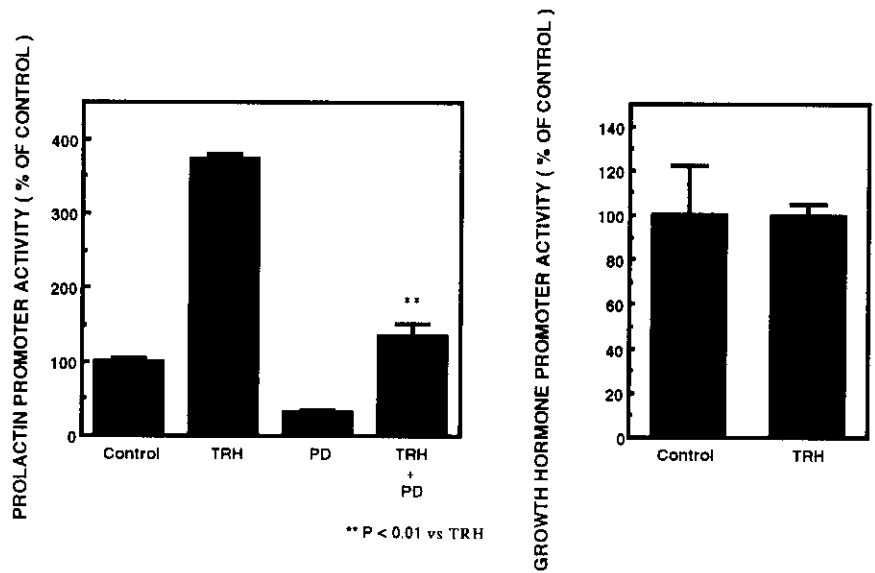


Figure 2



☒ 3



☒ 4

ヒト下垂体腺腫における一酸化窒素合成に関する検討

分担研究者 加藤 讓 (島根医科大学第一内科)
研究協力者 村上宜男 (同)
越村邦夫 (同)

【背景】

一酸化窒素 (NO) は下垂体ホルモン分泌に抑制的に作用する。我々は既にNOがGH3細胞のGHおよびプロラクチン分泌を抑制することを報告した (文献1)。ラット下垂体前葉細胞には脳型一酸化窒素合成酵素 (bNOS) が存在することが報告されている (文献2) が、下垂体細胞におけるNO産生の機序についてはなお十分明らかではない。我々は、bNOS mRNAを発現するGH3細胞を用いて、脱分極刺激やTRHがNOから変換される亜硝酸イオン濃度の培養液中濃度を増加させることを明らかにした。

今回は、ヒト下垂体前葉細胞におけるNOSの発現とNO産生機序について明らかにする目的で、ヒト下垂体腺腫細胞を用いてNO遊離とNOS免疫活性の発現について検討した。

【方法】

手術時に得たGH産生腺腫、プロラクチン産生腺腫および非機能性下垂体腺腫を用いた。細胞を酵素的に単離、浮遊させ、単層培養してNO遊離実験に用いた。試薬を添加したKrebs-Hepes液中で2時間反応させた後、培養液の亜硝酸イオン濃度を既報のHPLC法 (文献3) で測定した。

免疫組織学的検索には、Bouin液で固定した組織切片を、抗bNOSならびに抗iNOS抗体と反応させた。Avidin-biotin complex法とHorseradish Peroxidaseを用いて発色させた。

【結果】

非機能性腺腫細胞においては、LHRHの添加ならびに50 mMのKClによる脱分極刺激はいずれも培養液中の亜硝酸イオン蓄積量を増加させた (図1、左)。NOS拮抗剤、L-NAMEを添加した群では亜硝酸イオン量が低下傾向を示した (図1、右)。GH産生腺腫細胞における成績を図2に示す。3例中2例ではTRH、GRHならびに脱分極刺激は亜硝酸イオン量に影響を与えなかったが (図2、左、右)、他の腺腫では、TRHおよびKCl添加群で亜硝酸イオン量が増加する傾向を示した (図2、中央)。なお、同様に検討した他の一例では、基礎値が測定感度以下であった。一方、プロラクチン産生腺腫細胞においては、脱分極刺激は亜硝酸イオン量に影響を与えなかった。L-NAMEを添加した場合には、亜硝酸イオン量が低下する傾向が認められた。

免疫組織学的には、検討したGH産生腺腫組織2例のうち1例においてbNOS陽性細胞

が認められた。いずれの例においてもiNOS免疫活性のいずれも陰性であった。一方、プロラクチン産生腺腫組織では、3例中2例において明らかなiNOS免疫活性を有する細胞が認められた。他の1例では弱い反応性を認めた。3例全例においてbNOS免疫活性は陰性であった。

【考察】

非機能性ヒト下垂体腺腫細胞とGH産生腺腫細胞の一部において、脱分極刺激が培養液中亜硝酸イオン量を増加させた。細胞培養液中亜硝酸イオン量はL-NAMEの添加によって低下することから、NOSによるNO産生を反映すると考えられる。

TRHはGH3細胞培養液中の亜硝酸イオン濃度を増加させる。この効果は、細胞内カルシウムをキレートするBAPTAで前処理した細胞では抑制されることから、TRHの細胞内遊離カルシウム濃度増加作用を介することが示唆されている（文献3）。さらに、我々は既に、エスロラジオールで前処理したラット下垂体前葉初代培養細胞において、培養液中亜硝酸イオン濃度が細胞内遊離カルシウム濃度増加作用を有するGRHの添加によって増加することを報告した。したがって、GH3細胞やラット下垂体前葉初代培養細胞と同様に、非機能性ならびにGH産生ヒト下垂体腺腫細胞においても脱分極刺激による細胞内遊離カルシウム濃度の増加がNOSを活性化することが示唆される。本研究においては、GH産生腺腫組織の一部においてbNOS免疫活性陽性細胞が認められた。bNOSの酵素活性はカルシウム-カルモジュリンに依存するので（文献4）、bNOS免疫活性の存在は非機能性ならびにGH産生ヒト下垂体腺腫細胞における細胞内遊離カルシウム濃度増加がNOSを活性化することを支持する。さらに、本研究では、LHRHが非機能性腺腫の培養液中亜硝酸イオン量を増加させたが、この作用もLHRHの細胞内遊離カルシウム濃度増加作用を介する可能性が示唆される。

一方、プロラクチン産生腺腫細胞においては、脱分極刺激は培養液中亜硝酸イオン量に影響を与えず、免疫組織学的にはiNOS陽性細胞が認められた。したがって、プロラクチン産生腺腫のNO産生は非機能性腺腫やGH産生腺腫と異なり、カルシウム-カルモジュリン非依存性のNOSによることが示唆される。

【まとめ】

本研究からヒト下垂体腺腫細胞の多くはNOを遊離することが明らかにされた。非機能性腺腫やGH産生腺腫においては、少なくとも一部はbNOSが関与すること、ならびに脱分極刺激は細胞内遊離カルシウム濃度の増加を介してNO遊離を増加させることが示唆される。一方、プロラクチン産生腺腫では主にiNOSの発現によることが示唆される。

【文献】

1. Tsumori M, Murakami Y, Koshimura K, Kato Y: Endogenous nitric oxide inhibits growth

hormone secretion through cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanisms in GH3 cells. *Endocrine J* 46: 779-785, 1999 .

2. Ceccatelli S, Hulting A-L, Zhang X, Gustafsson L, Villar M, Hokfelt T: Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11292-11296, 1993.
3. Tsumori M, Murakami Y, Koshimura K, Kato Y: Thyrotropin-releasing hormone stimulates nitric oxide release from GH3 cells. *J Neuroendocrinol* 11: 451-456, 1999.
4. Bredt DS, Snyder SH: Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:682-685, 1990.

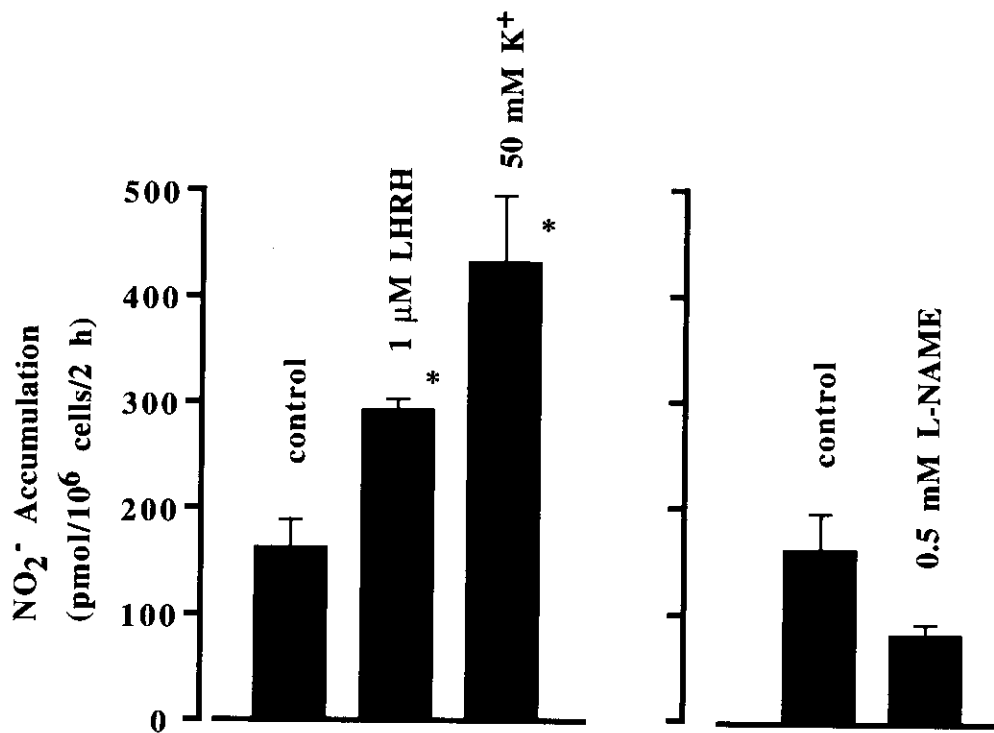


図1 非機能性ヒト下垂体腺腫細胞培養液中の亜硝酸イオン量に及ぼすLH-RH、脱分極刺激ならびにL-NAMEの影響

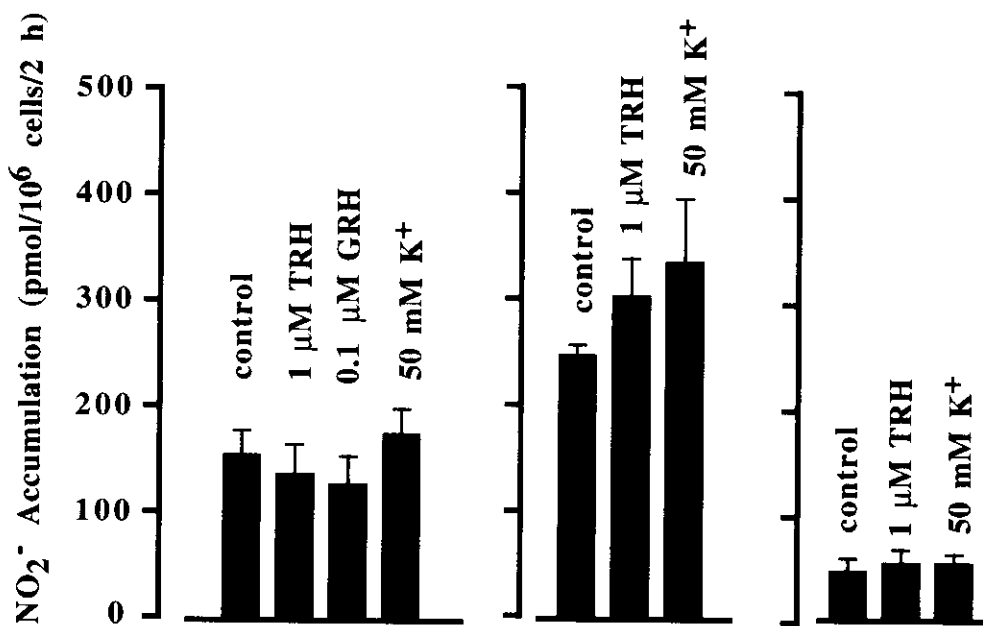


図2 GH産生ヒト下垂体腺腫細胞培養液中の亜硝酸イオン量に及ぼすTRH、GRHならびに脱分極刺激の影響

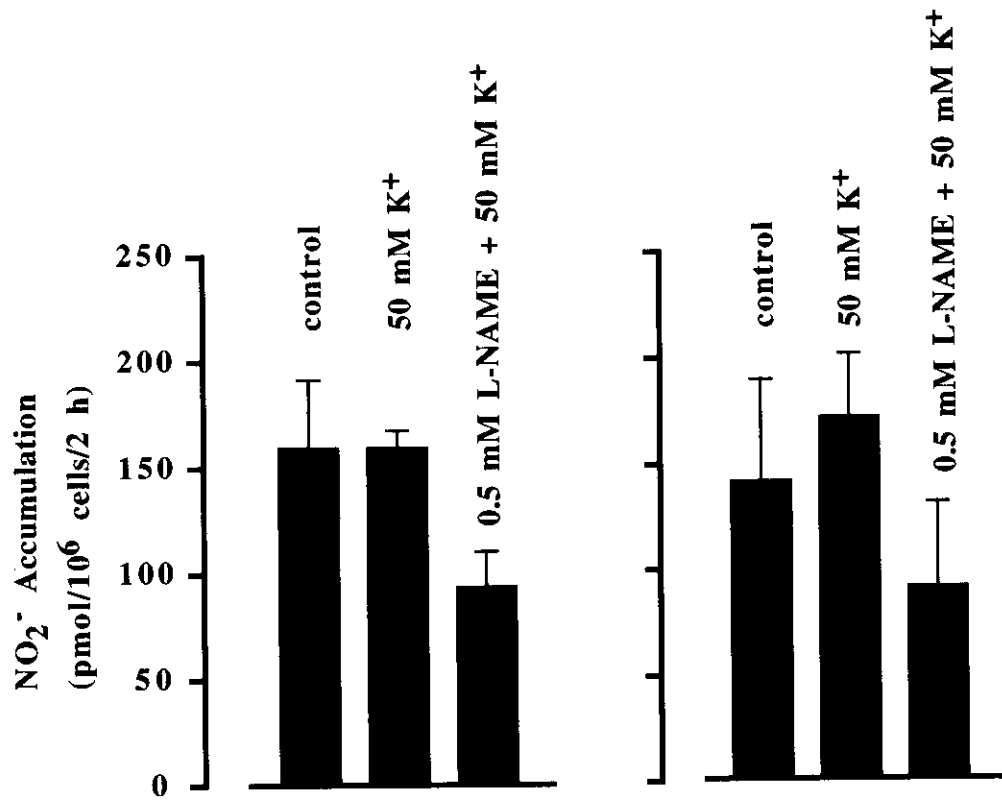


図3 プロラクチン産生ヒト下垂体腺腫細胞培養液中の亜硝酸イオン量に及ぼす脱分極刺激ならびにL-NAMEの影響